

# Comunicado Técnico

ISSN 0102-0110  
Novembro, 2015  
Brasília, DF

Foto: Vera Tavares de Campos Carneiro



## Identificação e Caracterização de Microssatélites e Desenho de *Primers* de Sequências Expressas de *Brachiaria brizantha*

Gláucia Salles Cortopassi Buso<sup>1</sup>  
Diva Maria de Alencar Dusi<sup>2</sup>  
Roberto Coiti Togawa<sup>3</sup>  
Zilneide Pedrosa de Souza Amaral<sup>4</sup>  
Vera Tavares de Campos Carneiro<sup>5</sup>

### Introdução

Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm sido amplamente utilizados em diferentes culturas, pois apresentam alta reprodutibilidade, simplicidade técnica (PCR), um custo relativamente baixo, grande poder de resolução, codominância e alto nível de polimorfismo. Apesar dessas vantagens, poucos desses marcadores eficazes têm sido desenvolvidos para *Brachiaria brizantha* (JUNGMAN, et al., 2009). Os marcadores microssatélites derivados de DNA genômico têm sido utilizados extensivamente ao longo da última década por causa do elevado interesse em suas propriedades (ELLEGREN, 2004). No entanto, eles não correspondem a sequências de codificação e, portanto, não facilitam a identificação de genes de interesse. Com o aumento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) disponíveis no banco de dados dbEST (BOGUSKI et al., 1993), surge uma fonte

complementar para identificação de microssatélites. Os ESTs são fragmentos de DNA complementar ao RNA mensageiro sequenciados e representam parte de uma região do genoma transcrito em certas condições fisiológicas. Assim, marcadores microssatélites formados a partir destes têm uma grande probabilidade de serem relacionados com porções funcionais do genoma, apesar da sua natureza conservada em relação a polimorfismos. A técnica de sequenciamento de RNA-seq gera um grande número de ESTs de bibliotecas de cDNA com a utilização de sequenciamento de última geração. Este método foi empregado para analisar o transcrito dos ovários em megasporogênese e megagametogênese de plantas sexuais e apomíticas de *B. brizantha* (CARNEIRO, et al., 2013). Visando ao desenvolvimento futuro de marcadores SSR, neste trabalho microssatélites foram identificados e caracterizados em sequências expressas do genoma de *B. brizantha* e *primers* SSR foram desenhados.

<sup>1</sup> Engenheira-agrônoma, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Engenheira-agrônoma, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bioinformata, Ph.D., Analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Gestora ambiental, Técnica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## Material e Métodos

As sequências analisadas estão disponíveis no banco restrito de sequências de *B. brizantha* (*Brachiaria brizantha* ovaries + LCM no <http://lbi.cenargen.embrapa.br/brachiaria>) – Projeto Embrapa SEG “Genômica funcional e controle genético da reprodução sexual e apomítica de plantas com perspectivas biotecnológicas”. Essas sequências foram geradas a partir de sequenciamento em larga escala de cDNAs de ovários em megasporogênese e megagametogênese de *B. brizantha* sexual e apomítica. A montagem das sequências baseou-se no genoma de *B. ruziziensis* (SILVA, et al., 2013). Para a identificação de sequências repetitivas nessa base de dados, foram consideradas todas as combinações de repetições de dois, três e quatro nucleotídeos, totalizando 312 (12 dinucleotídeos, 60 trinucleotídeos e 240 tetranucleotídeos) (Tabelas 1, 2 e 3). Os tri e tetranucleotídeos foram considerados em classes nas quais foram eliminadas as sobreposições e a complementaridade de bases. A mineração foi realizada com o uso dos seguintes critérios para os microssatélites: um mínimo de 12 pares de bases (bp) para di, 18 (bp) para trinucleotídeos e mínimo de 10 para tetranucleotídeos. A mineração de SSRs foi conduzida com base na procura de repetições (SSRs) no banco de sequências com a utilização do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponível no próprio banco de sequências de *B. brizantha*. As sequências mineradas foram submetidas ao programa *WebTroll* (MARTINS, et al., 2009) para confirmar e localizar os SSRs nas sequências, bem como verificar a presença de mais de um SSR na mesma sequência. Após a identificação, os SSRs foram caracterizados e os respectivos *primers* desenhados utilizando-se o programa *Primer 3* (UNTERGRASSER, et al., 2012).

## Resultados e discussão

Foram analisados 43.648 *contigs* disponíveis no banco de sequências de *B. brizantha*, que, após mineração, agrupamento e redução da redundância, resultaram em 315 *primers* EST-SSRs. Considerando-se todos os 312 tipos de microssatélites analisados (Tabelas 1, 2 e 3, e Figura 1), (AT)n foi a repetição mais abundante, sendo encontrada em 9,2% das 315 sequências

mineradas, seguida pela (ACG)n em 7,6%. Entre os 116 dinucleotídeos minerados (AT)n (25%) foi o mais abundante, seguido por (AC)n (15,5%), (GA)n e (CT)n (14,7 %) seguido por (GT)n (12,1%) e (CG)n (10,3%) (Tabela 1 e Figura 2). Considerando-se as repetições de trinucleotídeos, foram identificados 153 EST-SSRs. Entre estes, a classe mais abundante foi (ACG)n, identificada em 45,3% dos trinucleotídeos minerados, seguido por (AAG)n em 14,4%, (CCG)n em 13,7%, (AGG)n e (ACC)n em 11,1%, (AGC)n em 10,5% (Tabela 2). A frequência das outras classes foi menor do que 10%. Considerando-se os tetranucleotídeos, foram identificados 46 EST-SSRs. Entre estes, as classes mais abundantes foram (AAAC)n e (AAAG)n em 19,6% e 17,4%, respectivamente (Tabela 3 e Figura 2).

**Tabela 1.** Número de sequências e frequência de detecção de sequências repetitivas no banco de RNA-seq de *Brachiaria brizantha* contendo um mínimo de 12 pares de bases (bp) para dinucleotídeos.

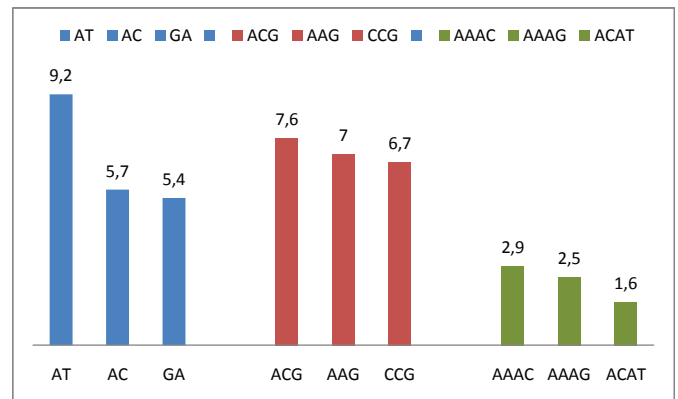
Dinucleotídeo	Classe	Número	Freq. <sup>1</sup> (%)	Freq. <sup>2</sup> (%)
(AT)n	-	29	25,0	9,2
(AC)n	-	18	15,5	5,7
(GA)n	-	17	14,7	5,4
(CT)n	-	17	14,7	5,4
(GT)n	-	14	12,1	4,4
(CG)n	-	12	10,3	3,8

**Tabela 2.** Número de sequências e frequência de detecção de sequências repetitivas no banco de RNA-seq de *Brachiaria brizantha* contendo um mínimo de 18 pares de bases (bp) para trinucleotídeos.

Trinucleotídeo	Classe	Número	Freq. <sup>1</sup> (%)	Freq. <sup>2</sup> (%)
AAC/TTG ACA/TGT CAA/GTT	(AAC)n	14	9,2	4,4
AAG/TTT AGA/TCT GAA/CTT	(AAG)n	22	14,4	7,0
AAT/TTA ATA/TAT TAA/ATT	(AAT)n	10	6,5	3,2
ACC/TGG CAC/GTG CCA/GGT	(ACC)n	17	11,1	5,4
ACG/TGC GAC/CTG CGA/GCT	(ACG)n	24	45,3	7,6
ACT/TGA CTA/GAT TAC/ATG	(ACT)n	6	3,9	1,9
AGC/TCG CAG/GTC GCA/CGT	(AGC)n	16	10,5	5,1
AGG/TCC GAG/CTC GGA/CCT	(AGG)n	17	11,1	4,4
AGT/TCA GTA/CAT TAG/ATC	(AGT)n	6	3,9	1,9
CCG/GGC CGC/GCG GCC/CGG	(CCG)n	21	13,7	6,7

**Tabela 3.** Número de sequências e frequência de detecção de sequências repetitivas no banco de RNA-seq de *Brachiaria brizantha* contendo um mínimo de 10 pares de bases (bp) para tetranucleotídeos.

Tetranucleotídeo	Classe	Número	Freq. <sup>1</sup> (%)	Freq. <sup>2</sup> (%)
AAAC/TTTG	(AAAC)n	9	19,6	2,9
ACAA/TG CAAA/GTTT	(AAAG)n	8	17,4	2,5
AGAA/TC GAAA/CTTT	(AAAT)n	3	6,5	1
ATAA/TA TAAA/ATTT	(AACC)n	0	0	0
AACC/TTGG	(AACC)n	0	0	0
CCAA/GG CAAC/GTTG	(AACG)n	1	2,2	0,3
AACG/TTGC	(AACG)n	1	2,2	0,3
CGAA/GC GAAC/CTTG	(AACT)n	1	2,2	0,3
AACT/TTGC	(AACT)n	1	2,2	0,3
CTAA/GA TAAC/ATTT	(AAGC)n	0	0	0
AAGC/TTGC	(AAGC)n	0	0	0
GCAA/CG CAAG/GTTC	(AAGG)n	2	4,4	0,6
AAGG/TTCC	(AAGG)n	2	4,4	0,6
GGAA/CC GAAG/CTTC	(AAGT)n	0	0	0
AAGT/TTCA	(AAGT)n	0	0	0
GTAA/CA TAAG/ATTC	(AATC)n	0	0	0
AATC/TTCC	(AATC)n	0	0	0
TCAA/AG CAAT/GTTA	(AATG)n	2	4,4	0,6
AATG/TTAC	(AATG)n	2	4,4	0,6
TGAA/AC GAAT/CTTA	(AATT)n	1	2,2	0,3
AATT/TTAA	(AATT)n	1	2,2	0,3
ACAG/TGTC	(ACAG)n	0	0	0
AGAC/TC GACG/CTGT	(ACAT)n	5	10,9	1,6
ACAT/TGTA	(ACAT)n	5	10,9	1,6
ATAC/TA TACA/ATGT	(ACCC)n	1	2,2	0,3
ACCC/TGGG	(ACCC)n	1	2,2	0,3
CCAC/GG CCCA/GGGT	(ACCG)n	0	0	0
ACCG/TGGC	(ACCG)n	0	0	0
CGAC/GC GACC/CTGG	(ACCT)n	0	0	0
ACCT/TGGA	(ACCT)n	0	0	0
CTAC/GA TACC/ATGG	(ACGC)n	0	0	0
ACGC/TGCG	(ACGC)n	0	0	0
GCAC/CG CACG/GTGC	(ACGG)n	2	4,4	0,6
ACGG/TGCC	(ACGG)n	2	4,4	0,6
GGAC/CC GACG/CTGC	(ACGT)n	0	0	0
ACGT/TGCA	(ACGT)n	0	0	0
GTAC/CA TACG/ATGC	(ACTC)n	1	2,2	0,3
ACTC/TGAG	(ACTC)n	1	2,2	0,3
TCAC/AG CACT/GTGA	(AGAT)n	3	6,5	1,0
ACTG/TGAC	(AGAT)n	3	6,5	1,0
AGAT/TCTA	(AGAT)n	1	2,2	0,3
ATAG/TA TAGA/ATCT	(AGCC)n	0	0	0
AGCC/TCGG	(AGCC)n	0	0	0
CCAG/GG CAGC/GTGC	(AGCG)n	1	2,2	0,3
AGCG/TCGC	(AGCG)n	1	2,2	0,3
CGAG/GC GAGC/CTCG	(AGCT)n	0	0	0
AGCT/TCGA	(AGCT)n	0	0	0
CTAG/GA TACG/ATCC	(AGGC)n	2	4,4	0,6
AGGC/TCCG	(AGGC)n	2	4,4	0,6
GCAG/CG CAGG/GTCC	(AGGG)n	2	4,4	0,6
AGGG/TCCC	(AGGG)n	2	4,4	0,6
GGAG/CC GAGG/CTCC	(AGGT)n	0	0	0
AGGT/TCCA	(AGGT)n	0	0	0
GTGC/CA TACC/ATCC	(AGTC)n	0	0	0
AGTC/TGAC	(AGTC)n	0	0	0
CCCG/GGGC	(CCCG)n	0	0	0
CGCC/GC GCCC/CGGG	(CCCG)n	0	0	0
CCGG/GGCC	(CCGG)n	1	2,2	0,3



**Figura 2.** Porcentagem das classes de repetições mais frequentes.

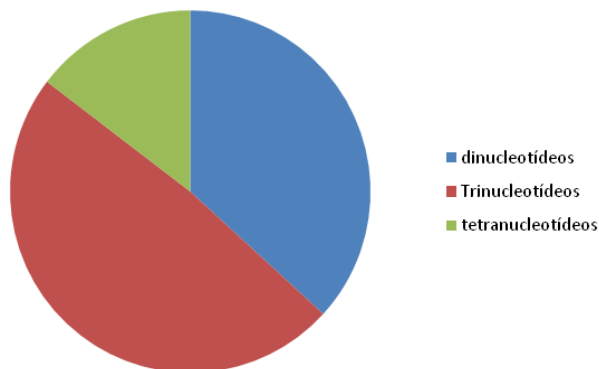
Parece que a detecção e o desenvolvimento de primers microssatélites do banco de sequências RNAseq foi bem eficiente quando comparado a outras iniciativas de desenvolvimento de primers microssatélites para a mesma espécie. Em Jungman et al. (2009), 96 clones de uma biblioteca genômica enriquecida foram sequenciados e 19 pares de primers foram desenhados. Outro conjunto de 15 primers para essa espécie foi publicado por Vigna et al. (2011) utilizando a mesma biblioteca.

Para todos os EST-SSRs, foram desenhados primers SSR e suas sequências foram depositadas no banco de sequências de *B. brizantha* e estão sendo sintetizados. Numa próxima etapa do trabalho, eles serão otimizados e caracterizados em uma amostra de acessos de *B. brizantha*.

## Referências

- BOGUSKI, M. S.; LOWE, T. M.; TOLSTOSHEV, C. M. dbEST – Database for “expressed sequence tags”. **Nat Genet.** 1993. Aug; 4(4):332-3.
- CARNEIRO, V. T. C.; SILVA-JUNIOR, O. B.; SILVEIRA, E. D.; GUIMARÃES, L. A.; COSTA, M. C.; TOGAWA, R. C.; RODRIGUES, J. C. M.; LACERDA, A. L. M.; DUSI, D. M. A.; ALVES-FERREIRA, M.; IRSIGLER, A. T.; PAPPAS, G. Deep sequencing-based transcriptome of *Brachiaria brizantha* as a tool for development studies of sexual and apomictic plants. In: INTERNATIONAL PLANT & ANIMAL GENOME, 21, 2013, San Diego. [Abstracts]... [S.l.: s. n.], 2013. Não paginado.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Review Genetics**,



**Figura 1.** Distribuição dos microssatélites di-, tri- e tetranucleotídeos.

London, v. 5, n. 6, p. 435-445, 2004.

JUNGSMANN, L.; SOUSA, A. C. B.; PAIVA, J.; FRANCISCO, P. M.; VIGNA, B. B. Z.; VALLE, C. B. do; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P. de. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stap. **Conservation Genetics**, v. 10, p. 1873-1876, 2009.

MARTINS, W. S.; LUCAS, D. C. S.; NEVES, K. F. S.; BERTIOLI, D. J.; WebSat: a web software for microSatellite marker development. **Bioinformatics**, v. 3, n. 6, p. 282-283, 2009.

SILVA, P. I. T.; MARTINS, A. M.; GOUVEA, E. G.; PESSOA-FILHO, M.; FERREIRA, M. E. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **BMC Genomics**, v. 14, p. 17, 2013.

UNTERGRASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3: new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, 2012.

VIGNA, B. B.; ALLEONI, G. C.; JUNGSMANN, L.; VALLE, C. B. do; SOUZA, A. P. de. New microsatellite markers developed from *Urochloa humidicola* (Poaceae) and cross amplification in different *Urochloa* species. **BMC Research notes**, v. 4, p. 523, 2011.

## Comunicado Técnico 198

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
**Endereço:** Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida  
 W5 Norte; Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil;  
 CEP: 70770-900  
**Fone:** (61) 3448-4700  
**Fax:** (61) 3340-3624  
**E-mail:** sac@cenargen.embrapa.br  
**1ª edição**  
 Publicação *online* (2015)

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



## Comitê Local de Publicações

**Presidente:** Maria Isabela Lourenço Barbirato  
**Secretário-Executivo:** Thales Lima Rocha  
**Membros:** Daniela Aguiar de Souza Kols, Lígia Sardinha Fortes,  
 Lucas Machado de Souza, Márcio Martinello Sanches, Rosamares  
 Rocha Galvão  
**Membros suplentes:** Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes,  
 João Batista Tavares da Silva

## Expediente

**Normalização bibliográfica:** Ana Flávia do N. Dias Côrtes  
**Revisão de texto:** José Cesamildo Cruz Magalhães  
**Tratamento das ilustrações:** José Cesamildo Cruz Magalhães  
**Editoração eletrônica:** José Cesamildo Cruz Magalhães